Journal of Horticultural Science
Vol. 35, No.2, Summer 2021, P. 183-194
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد 35، شماره 2، تابستان 1400، ص. 194-183
شاپا: 4730 - 2008

مقاله پژوهشی

اثر القای پلی‌پلوییدی درون شیشه‌ای بر تنوع صفات مورفولوژیکی و سیتولوژیکی بنفشه آفریقایی *Saintpaulia ionantha* Wendl.

اکرم امیری[1]- محمود شور[2]*- مینا تقی زاده[3]- سید حسین نعمتی[4]- علی تهرانی فر[5]

تاریخ دریافت: 1397/05/06
تاریخ پذیرش: 1399/05/01

چکیده

بنفشه آفریقایی (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) یک گیاه زینتی مشهور با شکل و رنگ‌های متنوع است و به عنوان یک گیاه مدل عالی جهت مطالعات باززایی در شرایط درون شیشه‌ای مطرح می‌باشد. این پژوهش با هدف القاء پلی پلوئیدی در شرایط درون شیشه‌ای و با استفاده از غلظت‌های مختلف کلشی‌سین انجام گرفت. گیاهچه‌های حاصل از کشت درون شیشه‌ای در مرحله پرآوری تحت تیمار کلشی‌سین قرار گرفتند. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور غلظت در سه سطح 0/02، 0/05 و 0/1 درصد و مدت زمان تیمار در سه سطح 18، 24 و 48 ساعت انجام گرفت. صفات ظاهری و آناتومیکی گیاهچه‌های باززایی شده مورد بررسی قرار گرفت. القای تتراپلوئیدی به‌گونه‌ای موفقیت آمیز توسط بررسی صفات مختلف ظاهری و بررسی‌های میکروسکوپی و فلوسایتومتری تایید شد. تیمار 0/02 درصد کلشی‌سین به مدت 24 ساعت در القای پلی‌پلوئیدی در بنفشه آفریقایی تحت شرایط درون شیشه‌ای موثر بود. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که تلفیق روش کشت درون شیشه‌ای با القای تتراپلوئیدی به‌عنوان یک روش سریع و کارآمد برای بدست آوردن اشکال و صفات جدید در گیاهان باززایی شده درون شیشه‌ای بنفشه آفریقایی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: باززایی، فلوسایتومتری، کلشی‌سین، میکسوپلوئید

مقدمه

جنس بنفشه آفریقایی (*Saintpaulia* sp.) رایج‌ترین جنس شناخته شده در بین گیاهان خانواده Gesneriaceae است. این گیاه بومی مناطق شرق افریقا شامل کنیا و تانزانیاست و 25 گونه دارد که گونه‌ی *ionantha* از مهم‌ترین گونه‌های آن است (31). از آن‌جایی که بنفشه آفریقایی کروموزوم‌های کوچکی دارد که تمایل به چسبندگی به یکدیگر را دارند تعداد کروموزوم‌های آن به اشتباه 2n=2x=28 گزارش شده بود (1). با مطالعات دقیق‌تر آنالیزهای سیتولوژیکی نشان داده شده است که تعداد کروموزوم‌های این گونه 2n=2x=30 است (7). این جنس برگ و گل‌های زیبایی دارد که نامنظم[6] هستند و رنگ‌ها و شکل‌های متنوعی دارند (28 و 29). تولید گیاهانی مانند بنفشه آفریقایی که علاوه بر زیبایی بسیار زیاد گل‌های آنان به دلیل توانمندی تولید گل در طول سال مورد توجه تولیدکنندگان تجاری آن واقع شده، دارای پیشرفت چشمگیری بوده، طوری که پرورش این گونه گیاهان خود در حوزه علم باغبانی جهان به شکل صنعت در آمده است.

پلی پلوئید کردن گیاهان، از راه‌های ایجاد تنوع و ترکیب خصوصیات مطلوب در گیاهان به شمار می‌رود. برای دست‌یابی به گیاهان پلی پلوئید می‌توان از ماده شیمیایی کلشی‌سین بعنوان کارامدترین ماده موثر بر روی تیوبولین بعنوان زیرواحد میکروتوبول ها استفاده کرد که از تشکیل رشته‌های دوک جلوگیری نموده و موجب

1- دانش آموخته دکتری گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد علوم و تحقیقات، تهران
2، 4 و 5- به‌ترتیب دانشیار، استادیار و استاد گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: Shoor@um.ac.ir)
3- دانشیار گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اراک، دانشگاه اراک، اراک

DOI: 10.22067/jhs.2021.58723.0

6- زیگومورف

دو برابر شدن محتوای ژنتیکی سلول‌های در حال تقسیم می شود (2). دو برابر کردن کروموزوم‌ها در شرایط درون شیشه‌ای (*in vitro*) و درون موجود (*in vivo*) قابل انجام است. روش دو برابر کردن کروموزوم‌ها در شرایط درون شیشه‌ای دارای یک‌سری مزایا مانند: تیمار تعداد بیشتری گیاه با حجم کمتری از مواد، کنترل شرایط آزمایش، اثر سمیت کمتر مواد شیمیایی، درصد موفقیت زیاد و امکان تیمار میکروسپور، کشت تعلیقی سلول و کالوس می‌باشد (21). پلی پلوئیدها اغلب دارای سلول‌های بزرگ‌تر، برگ‌های ضخیم‌تر، رشد کندتر، میزان آب بیشتر و تأخیر گلدهی همراه با افزایش دوره آن را نشان می‌دهند (15). حجم سلول‌های تتراپلوئید در مقایسه با گیاهان دیپلوئید معمولاً دو برابر می‌باشد. در حالی که سطح سلولی آن‌ها 1/5 برابر است. بنابراین زمانی که تولید سلول به فعالیت متابولیکی سطح سلول مرتبط باشد یک مزیت محسوب می‌گردد. البته محدودیت‌هایی در زمینه تولید گیاهان اتوتترا پلوئید وجود دارد، برای مثال بزرگ‌تر شدن جثه در اثر تتراپلوئید ممکن است وابسته به گونه و ژنوتیپ باشد. ضمناً در بعضی موارد برگشتگی سطح پلوئیدی به حالت پایه اولیه نیز مشاهده شده است، بنابراین می‌توان گفت که هر گیاهی به سطح پلوئیدی خاصی تحمل نشان می‌دهد (16). به‌نژادگران از این روش برای اهلی‌سازی و بهبود تجاری برخی از ژنوتیپ‌ها بهره‌برداری می‌کنند (32). پلی پلوئیدی باعث افزایش اندازه گل، تشدید رنگ گل و تغییر شکل گیاه می‌گردد. تحت شرایط درون شیشه‌ای پلی‌پلوئیدی کاربرد موفقیت‌آمیزی در چندین گیاه زینتی مانند ارکیده (32)، پروانش (12) و شمعدانی (13) داشته است. در طی چند دهه گذشته پلی‌پلوئیدی به‌گونه‌ای کارآمد موجب افزایش سطح پلوئیدی گیاهان زینتی شده است. تیمار قطعات ساقه‌ای جعفری در شرایط درون شیشه‌ای با کلشی‌سین 0/01 و 0/05 درصد به‌طور موثری باعث افزایش پلوئیدی که همراه با افزایش سلول‌های روزنه و کاهش تعداد آنها بود مشاهده شد (22).

در این مطالعه پلی‌پلوئید کردن گیاهان دیپلوئید بنفشه آفریقایی با قرار دادن شاخساره‌های باززایی شده درون شیشه‌ای در معرض ماده شیمیایی کلشی‌سین و تعیین بهترین غلظت و زمان تیمار و ارزیابی انواع تنوع حاصل در گیاهان سازگار شده در سطح صفات مورفولوژیکی و سیتوژنتیکی به منظور ایجاد بستری مناسب برای تحقیقات به‌منظور بهبود صفات زینتی این گیاه بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و اجرای تیمارها

در این آزمایش شاخساره‌های حاصل از کشت بافت ریز نمونه‌های برگی بنفشه آفریقایی در مرحله پرآوری در محیط کشت MS حاوی 2 میلی‌گرم بر لیتر BA، در معرض تیمارهای کلشی‌سین قرار گرفتند. برای تهیه محلول کلشی‌سین در غلظت‌های مورد نظر، مقدار لازم از پودر کلشی‌سین (سیگما) با رعایت مسائل ایمنی توزین و در دی متیل سولفوکساید 3 درصد حل شد. نحوه انجام آزمایش به این ترتیب بود که گلوله‌های پنبه‌ای استریل در زیر هود لامینارفلو با محلول های کلشی‌سین در غلظت‌های 0/02، 0/05 و 0/1 درصد آغشته گردیدند و بر روی مریستم شاخساره ها در شیشه‌های کشت قرار گرفتند و در فاصله‌های زمانی 18، 24 و 48 ساعت شاخساره‌های تیمار شده از شیشه‌های کشت خارج و پس از شست و شو با آب مقطر استریل در محیط کشت مناسب پرآوری (محیط کشت MS حاوی 2 میلی‌گرم در لیترBA) کشت شدند. شاخساره‌ها پس از دو ماه به شرایط برون شیشه‌ای و در بستر کشت شامل کوکوپیت –پرلایت انتقال یافتند.

صفات مورد ارزیابی

درصد زنده مانی گیاهچه‌ها هر یک ماه یک بار تا ماه سوم انجام گرفت و شامل شمارش گیاهچه‌های از بین رفته بود. مقایسات مورفولوژیکی در مورد گیاهان تیمار شده و گیاه شاهد پس از انتقال گلدان‌ها به گلخانه انجام گرفت و شامل اندازه‌گیری صفات رویشی مانند طول، عرض و ضخامت و تعداد برگ، طول و قطر دمبرگ با استفاده از کولیس دیجیتالی بود. مقایسه سایر صفات رویشی از قبیل رنگ برگ، رنگ رگبرگ، شکل نوک برگ، حاشیه برگ‌ها و تراکم کرک به صورت چشمی انجام گرفت. لازم به ذکر است که در مورد این صفات همه گیاهان با گیاه مادری مقایسه گردید.

به منظور ارزیابی‌های میکروسکوپی از اپیدرم فوقانی برگ گیاهان تیمار شده و شاهد به طور جداگانه نمونه‌هایی برای مقایسه اندازه سلول‌ها تهیه گردید و بر روی لام قرار داده شد و پس از قرار دادن لامل به روی آن‌ها، توسط میکروسکوپ نوری با عدسی شیئی 40x مقایسات مربوطه انجام شد. همچنین آنالیز سطح پلوئیدی گیاهان تیمار شده با کلشی‌سین پس از این که این گیاهان به خوبی رشد یافتند توسط دستگاه فلوسایتومتر (partecpA, Germany) صورت گرفت. نحوه‌ی آماده‌سازی نمونه‌ها برای آنالیز فلوسایتومتری به این ترتیب بود که از برگ‌های کاملاً رشد یافته قطعاتی به اندازه 0/5 سانتی متر مربع تهیه گردیده، 400 میکرولیتر از بافر استخراج هسته (محلول A کیت دستگاه، partec) به روی آن‌ها ریخته شد و با تیغ تیز به نحوی که از له‌شدگی بافت جلوگیری شود، مقطع برگی به خوبی خرد گردید. سپس محلول حاصله از فیلترهای مخصوص دستگاه عبور داده شد و 1600 میکرو لیتر محلول رنگ آمیزی هسته 4 و 6- دی آمیدیو – 2 فنیل ایندول (DAPI، محلول B کیت) به آن اضافه گردید و پس از 30 تا 60 ثانیه برای شمارش در دستگاه قرار داده شد. به طور معمول برای هر نمونه حجم حداقل 5000 هسته توسط دستگاه اندازه‌گیری و پیک‌های به دست آمده توسط نرم‌افزار

Mode Fit تفسیر گردید. (5 و 10).

طرح آماری و تجزیه و تحلیل‌های آماری

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی به صورت طرح فاکتوریل 3×3 انجام گرفت. فاکتور اول غلظت کلشی‌سین در سه سطح 0/02، 0/05 و 0/1 درصد و فاکتور دوم زمان تیمار در سه سطح 18، 24 و 48 ساعت با 6 تکرار و 6 مشاهده در هر تکرار بود. نمونه‌های شاهد بدون اعمال تیمار در نظر گرفته شدند. تجزیه آماری داده‌ها در کلیه آزمایشات با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS انجام شد و مقایسه میانگین تیمارها به وسیله آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال 5 درصد انجام گرفت.

نتایج و بحث

اثر کلشی‌سین بر زنده مانی گیاهچه‌های تیمار شده

تأخیر در رشد گیاهچه‌ها اولین تأثیر قابل رؤیت در اعمال تیمار کلشی‌سین بود. همان‌طور که در جدول 1 قابل ملاحظه است، در شرایط درون شیشه‌ای پس از گذشت سه ماه فقط شاخساره های تیمار شده با غلظت 0/02 درصد کلشی‌سین در هر سه زمان زنده ماندند و با افزایش زمان تیمار از درصد زنده مانی گیاهچه‌ها کاسته شد، به طوری که درصد زنده مانی در این غلظت در زمان‌های 18، 24 و 48 ساعت به ترتیب 77/76، 61/11 و 27/77 درصد بود.

جدول 1- اثر تیمارهای کلشی‌سین بر درصد زنده مانی گیاهچه‌های بنفشه آفریقایی در شرایط درون شیشه‌ای

Table 1- Effect of colchicine treatments on survival percentage of African violet plantlet sin *in vitro* culture

غلظت کلشی‌سین Colchicine density (%)	مدت زمان تیمار Duration of treatment (hour)	زنده مانی Survival (%)		
		The first month ماه اول	The second month ماه دوم	The third month ماه سوم
0.02	18	100.00	83.33	77.76
	24	72.22	63.88	61.11
	48	50.00	30.55	27.77
0.05	18	30.55	19.44	0.00
	24	25.00	13.88	0.00
	48	8.33	5.55	0.00
0.1	18	27.77	16.66	0.00
	24	11.11	5.55	0.00
	48	5.55	0.00	0.00
0 Control شاهد		100.00	100.00	100.00

غلظت‌های زیاد کلشی‌سین مخصوصاً بیشتر از 0/2 درصد در بسیاری از آزمایشات سبب مرگ همه یا تعدادی از نمونه‌ها گردیده و این رابطه معکوس بین غلظت کلشی‌سین و زمان استفاده از آن با بقاء نمونه‌ها در مورد مطالعات درون شیشه‌ای و برون شیشه‌ای در گیاهان مختلف صادق است (4). در مطالعاتی که بر روی گل داوودی[1] انجام شده بود، از غلظت‌های 0/01، 0/05، 0/1 و 0/15 درصد کلشی‌سین به مدت 12، 24، 36 و 48 ساعت بر روی ریز نمونه های اپی کوتیل و هیپوکوتیل جوانه‌ها در شرایط درون شیشه‌ای استفاده شده بود. نتایج نشان داده بود که بیش از 90 درصد از جوانه‌های انتقال یافته به محیط کشت MS حاوی کلشی‌سین به تدریج از بین رفتند و با افزایش زمان غوطه وری در کلشی‌سین سرعت بقاء به طور معنی‌داری کاهش یافته بود (17). در تحقیقی که بر روی گیاه ریحان[2] انجام شد، غلظت‌های بالاتر کلشی‌سین باعث از بین رفتن درصد بالاتری از گیاهان شدند (18). در این تحقیق نیز کاملاً بدیهی است که با افزایش زمان و غلظت کلشی‌سین از میزان مقاومت گیاهچه‌ها کاسته شده است. به نظر می‌رسد فعالیت کلشی‌سین ممکن است در مریستم متمرکز باشد و یک اختلال فیزیولوژیکی در کاهش تقسیم سلولی و یا مرگ ریز نمونه ها ایجاد کند (25).

اثر کلشی‌سین بر صفات ظاهری گیاهچه‌های تیمار شده

ویژگی‌های مورفولوژیک صفات رویشی و زایشی گیاهان تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید به منظور امکان استفاده از این پارامترها در تعیین تتراپلوئیدهای احتمالی در شرایط درون شیشه‌ای مورد

1- *Chrysantemum cinerariifolium*

2- *Ocimum basilicum* L.

ارزیابی قرار گرفت. از آن جا که فقط گیاهچه‌های تیمار 0/02 درصد کلشی‌سین در هر سه زمان 18، 24 و 48 ساعت زنده ماندند. بنابراین نتایج مربوط به اثر این تیمار بر صفات رویشی و زایشی تجزیه و در جدول تجزیه واریانس 2 و 3 ارائه شد و پنج صفت رنگ، نوک و حاشیه برگ، رنگ رگبرگ و تراکم کرک نیز به صورت مقایسه چشمی مورد ارزیابی قرار گرفت. اثر تیمار کلشی‌سین بر روی طول و قطر دمبرگ، ضخامت و عرض برگ در سطح احتمال 1 درصد معنی‌دار بود (جدول 2). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که طول دمبرگ گیاهان شاهد (23/62 میلی‌متر) به طور معنی‌داری از گیاهان تیمار شده بیشتر بود که این نشان دهنده اثر کلشی‌سین در ایجاد رشد کپه‌ای و کوتاهی قد در گیاهان تیمار شده است. در مقایسه میانگین آزمون دانکن (جدول 3) در سطح احتمال 5 درصد، بیشترین قطر دمبرگ به ترتیب مربوط به گیاهان تیمار شده با غلظت 0/02 درصد کلشی‌سین به مدت 48 ساعت (2/48 میلی‌متر)، پس از آن 24 ساعت (2/31 میلی‌متر) و سپس 18 ساعت (1/94 میلی‌متر) و در انتها شاهد (1/54 میلی‌متر) بود. به عبارت بهتر با افزایش زمان در معرض بودن مریستم شاخساره‌ها در کلشی‌سین میزان اثرگذاری آن بر قطر دمبرگ افزایش یافته است (جدول 3). با توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول 2) این نتیجه مشاهده شد که، اگر چه تیمار مورد نظر بر طول برگ‌های بنفشه آفریقایی اثر معنی داری نداشته است. اما تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال 1 درصد بر عرض برگ‌ها گذاشته است، به طوری‌که عرض برگ‌های گیاهان تیمارشده نسبت به شاهد بیشتر بود. این نشان‌گر این است که تیمار کلشی‌سین در ظاهر برگ‌ها نیز تأثیر داشته و برگ‌های گیاهان پلی پلوئید نسبت به شاهد پهن‌تر بوده است (جدول 3). ضخامت برگ در گیاهانی که مدت زمان بیشتری در معرض کلشی‌سین قرار گرفته بودند از شاهد بیشتر بود، به طوری‌که بیشترین ضخامت برگ‌ها مربوط به تیمار 48 ساعت با 1/97 میلی‌متر بود و کم‌ترین آن مربوط به تیمار شاهد با 0/89 میلی‌متر بود (جدول 3). طبق جدول تجزیه واریانس 4 اثر تیمارها بر صفات زایشی قطر گل و تعداد گلبرگ در سطح احتمال 1 درصد و بر تعداد گل در هر گل آذین در سطح احتمال 5 درصد معنی‌دار بود. بر اساس جدول مقایسه میانگین 5، قطر گل و تعداد گلبرگ در گیاهان تیمار یافته نسبت به شاهد بیشتر بود و بین تیمارهای زمانی 18، 24 و 48 ساعت تفاوت معنی‌دار نبود. بیشترین تعداد گل در گل آذین در زمان‌های 24 و 48 ساعت به ترتیب با تولید 5/2 و 5/8 گل در گل آذین بود. کم‌ترین تعداد گل هم در گیاهان شاهد با تولید میانگین 3/20 گل در گل آذین مشاهده شد.

جدول 2- تجزیه واریانس صفات رویشی بنفشه آفریقایی تحت تیمار کلشی‌سین در شرایط درون شیشه‌ای

Table 2- ANOVA for vegetative traits of African violet treated by colchicine in *in vitro* culture

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	تعداد برگ Leaf number	طول دمبرگ Petiole length	طول برگ Leaf length	عرض برگ Leaf width	قطر دمبرگ Petiole diameter	ضخامت برگ Leaf thickness
Time زمان	3	26.44^{ns}	164.09**	56.24^{ns}	167.11**	2.93**	2.72**
Error خطا	43	19.95	8.18	25.36	22.82	0.23	0.12

ns: عدم تفاوت معنی دار و **: معنی‌دار در سطح احتمال 1 درصد

^{ns}: Non-Significant, and ** significant at 0.01 of probability levels.

جدول 3- اثر غلظت 0/02 درصد کلشی‌سین در تیمارهای زمانی 18، 24 و 48 ساعت بر صفات رویشی در شرایط درون شیشه‌ای

Table 3- The effect of colchicine 0.02% for 18, 24 and 24 hours on vegetative traits of African violet in *in vitro* culture

غلظت کلشی‌سین Colchicine concentration (%)	زمان Time (hours)	طول دمبرگ Petiole length (mm)	عرض برگ Leaf length (mm)	قطر دمبرگ Petiole diameter (mm)	ضخامت برگ Leaf thickness (mm)
0.02	18	16.75b	28.36a	1.94bc	1.64b
	24	16.34b	27.98a	2.31b	1.84ab
	48	16.79b	26.31a	2.84a	1.97a
0 Control شاهد	-	23.62a	20.82b	1.54c	0.89c

در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل در یک حرف مشترک هستند، از نظر آماری بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال 5 درصد تفاوت معنی داری ندارند.

Numbers followed by the same letter are not significantly different at 5% of probability level based on Duncan's multiple range test.

جدول 4- تجزیه واریانس صفات زایشی بنفشه آفریقایی تحت تیمار کلشی‌سین در شرایط درون شیشه‌ای

Table 4- ANOVA for reproductive traits of African violet treated by colchicine in *in vitro* culture

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	قطر گل Flower diameter (mm)	تعداد گلبرگ Number of petal	تعداد گل در هر گل آذین Number of Flower in inflorescence	ارتفاع گل آذین Height of inflorescence(mm)
Time زمان	3	31.18**	5.51**	6.31*	35.54[ns]
Error خطا	16	2.57	0.75	1.35	19.98

ns: عدم تفاوت معنی‌دار، * و **: معنی‌دار در سطح احتمال 5 و 1 درصد

ns: Non-Significant, * and ** significant at 0.05 and 0.01 of probability levels, respectively.

جدول 5- اثر غلظت 0/02 درصد کلشی‌سین در تیمارهای زمانی 18، 24 و 48 ساعت بر صفات زایشی بنفشه آفریقایی در شرایط درون شیشه‌ای

Table 5- The effect of colchicine 0.02% for 18, 24 and 24 hours on reproductive traits of African violet in *in vitro* culture

غلظت کلشی‌سین Colchicine concentration (%)	زمان Time (hours)	قطر گل Flower diameter (mm)	تعداد گلبرگ Number of petal	تعداد گل در هر گل آذین Number of flower in inflorescence	ارتفاع گل آذین Height of inflorescence (mm)
	18	41.14a	7.20a	4.40ab	79.99a
0.02	24	41.11a	7.60a	5.20a	81.91a
	48	40.58a	6.60a	5.80a	79.35a
Control شاهد	-	35.98b	5.20b	3.20b	85.29a

در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل در یک حرف مشترک هستند، از نظر آماری بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال 5 درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

Numbers followed by the same letter are not significantly different at 5% of probability level based on Duncan's multiple range test.

استفاده از کلشی‌سین با غلظت‌ها و زمان‌های متفاوت بر روی گیاهان مختلف به ویژه گیاهان زینتی به منظور تولید گیاهان با سطح پلوئیدی بالاتر در سال‌های اخیر مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. موفقیت سایر مواد شیمیایی در تولید پلی پلوئیدی به اندازه کلشی‌سین نمی‌باشد. به نظر می‌رسد اثرات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی پلی پلوئیدی بر حسب نوع گیاه متفاوت است. به طور کلی گیاهان تتراپلوئید معمولاً اندامی بزرگ‌تر، ساقه‌های ضخیم‌تر، برگ‌های کلفت‌تر، گل‌های بزرگ‌تر و میوه‌های درشت‌تری دارند (12). در این تحقیق نیز برخی از این تغییرات به وضوح دیده شد. تولید میوه‌های بزرگ‌تر و بدون هسته با استفاده از تیمار کلشی‌سین در ازگیل ژاپنی[3] گزارش شده است (3). تقریباً بدون استثناء پلی پلوئیدی سبب افزایش اندازه سلول و به خصوص بافت‌های مریستمی می‌شود. همچنین سلول‌های روزنه و دانه‌های گرده گیاهان پلی پلوئیدی که توسط کلشی‌سین تولید شده‌اند بزرگ‌تر هستند. در آزمایشی که بر روی سوسن[4] ارقام Con. Amore و Acapulco با استفاده از کلشی‌سین بر روی جوانه‌های گل جوان در شرایط درون شیشه‌ای انجام شده بود، نتایج بیانگر آن بود که بعد از ایجاد تیمار با کلشی‌سین قطر دانه‌های گرده 30 درصد افزایش یافته بود و کلاله نیز بزرگ‌تر و گوشتالود شده بود (11). در گل داوودی نیز با اعمال تیمار کلشی‌سین در شرایط درون شیشه‌ای اندازه سلول‌های روزنه گیاهان تتراپلوئید 1/53 برابر بزرگ‌تر از گیاهان دیپلوئید بود (17). ضخامت برگ‌ها در گیاهان پلی پلوئید به علت افزایش اندازه سلول‌ها بیشتر است. معمولاً برگ‌ها کوتاه‌تر ولی پهن‌تر می‌باشند. در این تحقیق نیز ضخامت برگ‌های تیمار شده نسبت به گیاهان شاهد بیشتر بود. همچنین طول دمبرگ ها نیز در هر دو شرایط کمتر از شاهد بود که این می‌تواند نشان دهنده رشد کپه‌ای و کوتاهی قد در گیاهان تیمار شده باشد. از نظر شکل و اندازه برگ‌ها نیز گیاهان تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید به طور عمده در گیاهان تیمار شده بزرگ‌تر بود و البته تعداد برگ‌ها نسبت به گیاهان دیپلوئید کمتر و کندی رشد آن‌ها به طور واضح قابل تشخیص بود.

نتایج مقایسه ظاهری نمونه‌ها نشان داد که رنگ برگ گیاهان شاهد شبیه به رنگ برگ گیاهان مادری بود. برگ‌های گیاهان مربوط به تیمار 24 ساعت به طور متوسط از برگ‌های گیاهان مادری کم رنگ‌تر و گیاهان تیمار شده در 18 و 48 ساعت پر رنگ‌تر از سایر

1- *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl

2- Oriental lilies

گیاهان و به رنگ تیره بودند. به دلیل این که در میان گیاهان تیمار شده بنفشه آفریقایی از نظر رنگ رگبرگ‌ها تنوع زیادی دیده شد، تصمیم گرفته شد رگبرگ‌ها از نظر رنگ در 5 گروه زیر دسته‌بندی گردند: برگ‌های معمولی که رگبرگ‌های فرعی و اصلی با سایر قسمت‌های برگ هم رنگ بود (شبیه گیاهان مادری)، گیاهانی که رگبرگ اصلی و فرعی کم رنگ‌تر از سایر قسمت‌های پهنک بود، گیاهانی که قسمت‌های پایین و نزدیک دمبرگ کم رنگ‌تر بود، گیاهانی که رگبرگ اصلی کم رنگ‌تر از سایر قسمت‌های برگ بود و گیاهانی که دارای رگبرگ اصلی کم رنگ و فرعی پررنگ بود. نتایج نشان داد که رگبرگ‌های گیاهان شاهد و زمان 24 ساعت به رگبرگ‌های گیاهان مادری شبیه بودند، در حالی که در تیمار 18 ساعت به طور متوسط برگ‌ها دارای رگبرگ اصلی کم رنگ و فرعی پررنگ بودند و در تیمار 48 ساعت اکثر گیاهان دارای رگبرگ اصلی کم رنگ‌تر از سایر قسمت‌های برگ بودند (شکل 1).



شکل 1- تنوع در شکل، رنگ، رگبرگ، نوک و حاشیه برگ حاصل از اعمال تیمار کلشی‌سین بنفشه آفریقایی در شرایط درون شیشه‌ای

Figure 1- Variation in form, color, vein, tip and margins of African violet leaf resulted from colchicine treatment in *in vitro*culture

از نظر نوک برگ، برگ‌ها در سه دسته نوک تیز، معمولی و گرد قرار گرفتند. با توجه به مقایسه چشمی نمونه‌ها مشخص شد، شکل نوک برگ‌ها در تیمار 18 و 48 ساعت همانند شاهد به صورت معمولی و مانند گیاه مادری بودند. اما نوک برگ‌ها در تیمار 24 ساعت به صورت تیز بود. در چند مورد در تیمار 18 ساعت و در یک مورد در تیمار 48 ساعت هم نوک برگ‌ها به صورت گرد دیده شد. شکل حاشیه برگ‌ها نیز شامل صاف و کنگره دار بود. تقریباً همه گیاهان دارای حاشیه صاف بودند. اگرچه در چند مورد در گیاهان تیمار شده مربوط به تیمار 0/02 درصد 18 ساعت است، حاشیه برگ‌ها کنگره‌دار بوده و تفاوت آن با گیاهان شاهد به وضوح قابل تشخیص بود (شکل 2).





شکل 2- نمونه‌ای از گیاهان باززایی شده تحت تیمار 0/02 درصد به مدت 18 ساعت با برگ‌های بنفشه آفریقایی دارای حاشیه کنگره دار و تغییر یافته حاصل از شرایط درون شیشه‌ای (A) در مقایسه با گیاه شاهد با برگ های لبه صاف (B)

Figure 2- A sample of regenerated African violet plant treated by 0.02% colchicine for 18 hour with serrated and modified margin in leaves (A) in comparison with control plants with smooth marigin in leaves (B)

تا کنون گزارشی راجع به اعمال کلشی‌سین بر روی شاخساره های حاصل از کشت بافت بنفشه آفریقایی دیده نشده است. فقط گزارش‌هایی مبنی بر اعمال تیمار کلشی‌سین بر قلمه‌های برگی بنفشه آفریقایی وجود دارد. سینویرتنه و همکاران (20) تولید گیاهانی با خصوصیات جدید با استفاده از کلشی‌سین بر روی قلمه‌های بنفشه آفریقایی مورد مطالعه قرار دادند. نتایج آزمایشات آنان نشان داد که ارتفاع گل آذین با تیمار کلشی‌سین به طور معنی‌داری کاهش یافت و در برخی از تیمارها افزایش تعداد گلبرگ، تغییر رنگ گل‌ها و شکل برگ‌ها دیده شد و نتیجه کلی آزمایشات آن‌ها بیانگر وابستگی موتاسیون القا شده به غلظت و زمان بود که با نتایج این تحقیق

مطابقت داشت.

تأخیر در گل‌دهی نیز به دلیل کندی رشد از دیگر اثرات کلشی‌سین می‌باشد. در این آزمایش‌ها دیده شد که گیاهان شاهد رشد قابل ملاحظه‌ای نسبت به گیاهان تیمار شده داشت و پس از انتقال به شرایط برون شیشه‌ای پس از 2 هفته به گلدان‌های بزرگ‌تر انتقال یافتند، در حالی که گیاهان تیمار شده پس از 18 هفته آماده انتقال به گلدان‌های بزرگ‌تر بودند (شکل 3). گیاهان شاهد پس از 20 هفته گل دادند، در حالی که اولین گل در گیاهان تیمار شده با 12 هفته تأخیر یعنی پس از 32 هفته ظاهر شد و در بعضی از تیمارها تا 24 هفته تأخیر مشاهده شد. به طور کلی درجه رشد پلی پلوئیدها کمتر از دیپلوئیدها می‌باشد (25). در مقایسه درجه رشد گیاهان پلی‌پلوئید و دیپلوئید، مشاهده شده است که مقدار هورمون اکسین که مسئول رشد می‌باشد، در گیاهان پلی پلوئید کمتر بوده و گل‌دهی گیاهان پلی‌پلوئید به تأخیر می‌افتد و مدت گل‌دهی افزایش می‌یابد (8). گفته شده است که پاسخ اندام‌های سوماتیکی به فعالیت کلشی‌سین نسبت به سلول‌های میوزی راحت‌تر است (24).

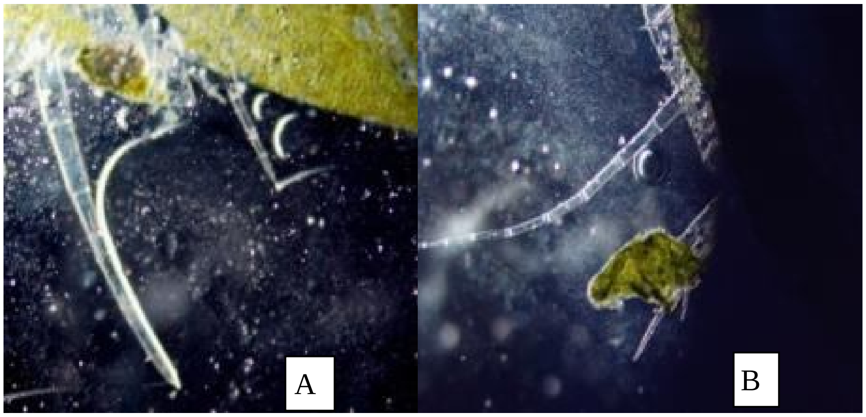


شکل 3- مقایسه رشد گیاه شاهد (گلدان سمت چپ) و گیاهان تیمار یافته با کلشی‌سین (گیاهان سمت راست) در بنفشه آفریقایی

Figure 3- Comparison between the growth of control (pot left) and colchicine treated plants (plants right) in African violet

اثر تیمار کلشی‌سین بر صفات میکروسکوپی گیاهچه‌های تیمار شده

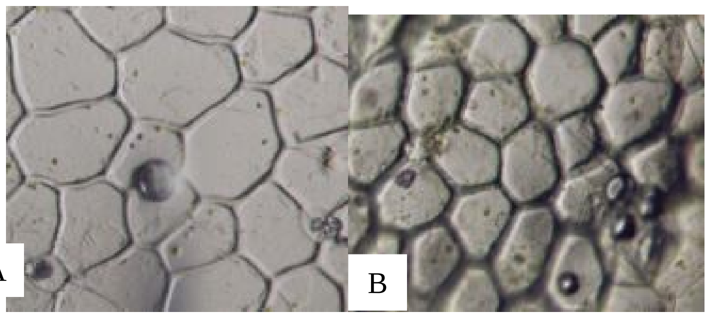
از نظر تراکم کرک، نمونه‌ها در سه دسته شامل تراکم کرک خیلی کم، متوسط و گیاهان با کرک‌های خیلی زیاد تقسیم‌بندی شدند. نتایج نشان داد که تراکم کرک در تیمارهای 18 و 24 ساعت خیلی کم بود، در حالی که در تیمار 48 ساعت و شاهد تراکم کرک‌ها متوسط بود. در تیمار 0/02 درصد کلشی‌سین به مدت 24 ساعت در یک تکرار در مقایسه با سایر تیمارها کرک‌های گیاه بسیار بلند و متراکم بود، به طوری که حتی با چشم غیر مسلح نیز دیده می‌شد. تصویر میکروسکوپی شکل4 بلند بودن کرک‌های گیاه تیمار شده را در مقابل گیاه شاهد نشان می‌دهد.



شکل 4- مقایسه کرک‌های برگ گیاه بنفشه آفریقایی (بزرگنمایی 4x) تیمار شده با 0/02 درصد کلشی‌سین به مدت 24 ساعت در شرایط درون شیشه‌ای در (A) و گیاه شاهد (B)

Figure 4- Compare leaves trichomes of treated (A) African violet by colchicine 0.02% for 24 hours *in vitro* conditions (4x) and control plant (B)

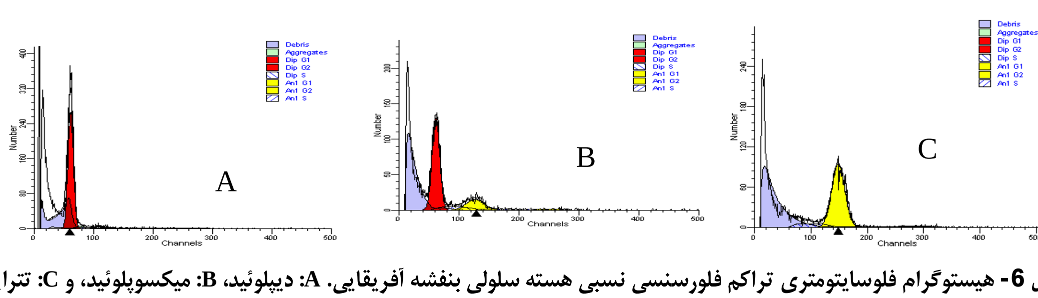
همان طور که در شکل 5 دیده می‌شود، بزرگ‌تر بودن سلول‌های اپیدرمی و محافظ روزنه سلول‌های تتراپلوئید نسبت بـه نمونـه‌هـای دیپلوئید کاملاً مشهود است، که این می‌تواند به عنـوان یـک مـلاک قوی در تشخیص و جداسازی گیاهـان بنفشـه آفریقـایی بـا سـطوح پلوئیدی مختلف تلقی گردد. در حقیقت می‌توان چنین اظهار نمود که افزایش اندازه سلولی یکی از اثرات عمومی القاء تتراپلوئیدی در بنفشه آفریقایی باشد. به نظر می‌رسد که این یک اثر ژنتیکی است و افزایش اندازه در همه اندام‌ها از قبیل دانه گرده، سلول‌های روزنه، بـذر، گـل، برگ و ساقه را به همراه دارد (20). طبق گفته مسترسون (19) حجم سلول‌های تتراپلوئید حدود دو برابر و سطح غشای آن‌ها حدود یک و نیم برابر سلول‌های دیپلوئیدمی‌باشد که این باعث بزرگ‌تر شدن جثه گیاهان در پاسخ به پلی پلوئیدی می‌شود. پیش از این لیو و گاو (17) با استفاده از تصاویر میکروسکوپی که از روزنه‌های سـلول‌هـای پلـی پلوئید در مقایسه با سلول‌های دیپلوئید تهیه کرده بودند، بزرگ‌تر بودن روزنه‌های گیاهان پلـی پلوئیـدی داوودی را در مقایسـه بـا گیاهـان دیپلوئید با استفاده از تصاویر میکروسکوپی نشـان دادنـد. در بنفشـه آفریقایی روزنه‌هـا بسـیار سـخت دیـده مـی‌شـدند، بنـابراین انـدازه سلول‌های اپیدرمی به عنوان معیار بزرگ‌تر بـودن سـلول‌هـا در نظـر گرفته شد. دهقان (5) نیز با مقایسه میکروسکوپی سلول‌های اپیدرم در نمونه‌های دیپلوئید و تتراپلوئید گیاه بذرالبنج مصری، بزرگ‌تـر بـودن سلول‌های اپیدرمی نمونه‌های تتراپلوئید را نشان داد.



شکل 5- تصاویر میکروسکوپی سلول‌های اپیدرم بنفشه آفریقایی در نمونه‌های دیپلوئید (A) و تتراپلوئید (B) (درشت نمایی 40x)

Figure 5- Mmicroscopic pictures (40x) of African violet epidermal cells in diploid (A) and tetraploid samples

برای تمام گیاهان تیمار شده با کلشی‌سـین و چنـد گیـاه شـاهد دیپلوئید به عنوان شاهد، آنالیز فلوسایتومتری صورتپذیرفت. بر اساس پیک‌های به دسـت آمـده از فلوسـایتومتری، گیاهـان در سـه دسـته دیپلوئید، میکسوپلوئید و تتراپلوئید قرار گرفتند. همان‌طور که در شکل 6 دیده می‌شود، گیاهان تتراپلوئید دارای یک پیک بـا میـانگین 150 است، در حالی که نمونه دیپلوئید یک پیک با میـانگین 60 را نشـان می‌دهد. نمونه‌های میکسوپلوئید پیک‌های مربوط به گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید را هم‌زمان نشان داده و دارای دو پیک است که میـانگین پیک اول 60 و پیک دوم 120 است که حاکی از وجـود سـلول‌هـای دیپلوئید و تتراپلوئید در آن‌ها می‌باشد.



شکل 6- هیستوگرام فلوسایتومتری تراکم فلورسنسی نسبی هسته سلولی بنفشه آفریقایی. A: دیپلوئید، B: میکسوپلوئید، و C: تتراپلوئید

Figure 6- Representative flow cytometer histograms of the relative fluorescence intensity of nuclei isolated from African violet. Diploid profile (A), Mixoploid (B), and Tetraploid (C)

نتایج حاصل از ایـن تحقیـق نشـان داد کـه بـا افـزایش زمـان کلشی‌سـین از تعـداد گیاهـان دیپلوئیـد کاسـته شـده و بـه گیاهـان میکسوپلوئید و تتراپلوئید افزوده گشته است. غیـور (9) در آزمایشـات فلوسایتومتری که بر روی گیاهچه‌های تیمار یافته ژربرا با اوریزالین در

شرایط درون شیشه‌ای انجام داده بود، همین نتیجه را گزارش کردند.

نتایج فلوسایتومتری گیاهان تیمار شده با کلشی‌سین در شرایط درون شیشه‌ای نشان داد که با افزایش زمان تیماردهی از 18 به 48 ساعت از میزان گیاهان دیپلوئید کاسته شده است. به طوری‌که میزان گیاهان دیپلوئید در سه زمان 18، 24 و 48 ساعت به ترتیب 23/52، 14/28 و 0 درصد بود، در عوض با افزایش زمان تیماردهی به درصد گیاهان تتراپلوئید و میکسوپلوئید افزوده شده است و همان طور که در جدول 6 ملاحظه می‌شود، در شرایط درون شیشه‌ای در هر سه زمان بیشتر گیاهان تیمار شده میکسوپلوئید شده‌اند.

جدول 6- درصد گیاهان دیپلوئید، میکسوپلوئید و تتراپلوئید بنفشه آفریقایی در شرایط درون شیشه‌ای

Table 6- The percentage of diploid, Mixoploid and tetraploid plants of African violet in *in vitro* conditions

غلظت کلشی‌سین Colchicine concentration (%)	زمان Time (hours)	دیپلوئید Diploid (%)	میکسوپلوئید Mixoploid (%)	تتراپلوئید Tetraploid (%)
	18	23.52	64.70	11.76
0.02	24	14.28	64.28	21.42
	48	0.00	80.00	20.00

در آزمایشی که بر روی گیاه *Mecardonia tenella* در غلظت‌های 0، 0/001 و 0/01 درصد برای 24 و 48 ساعت در ریز نمونه‌های قطعات گره‌ای در شرایط درون شیشه‌ای صورت گرفته بود، نتایج حاصل از آزمایشات فلوسایتومتری نشان داده بود که بیش از 50 درصد گیاهانی که تحت تأثیر کلشی‌سین قرار گرفته بودند، دارای محتوای DNA دو برابر بودند و هیچ‌کدام از گیاهان دیپلوئید نبودند (6). ایجاد گیاهان میکسوپلوئید از این نظر که مریستم گیاهان از سلول‌های زیادی تشکیل شده و ممکن است تمایل جذب کلشی‌سین در آن‌ها متفاوت باشد دور از انتظار نمی‌باشد (27). از عوامل دخیل که می‌تواند در تولید میکسوپلوئید نقش داشته باشد، تأثیر انحصاری کلشی‌سین بر سلول‌های در حال تقسیم است. بنابراین پلی‌پلوئیدی به طور مساوی در تمام سلول‌های نمونه رخ نداده و میکسوپلوئیدی را به همراه خواهد داشت (20).

بطور کلی نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که تیمار گیاهچه‌های باززایی شده با 0/02 درصد کلشی‌سین به مدت 18 ساعت در شرایط درون شیشه‌ای بهترین تیمار به منظور ایجاد تنوع در بنفشه آفریقایی می‌تواند باشد. گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید از نظر خصوصیات مورفولوژیک رویشی مانند اندازه، ضخامت، تعداد، حاشیه، نوک و رنگ برگ و زایشی مانند تعداد گل و گلبرگ، قطر گل و همچنین اندازه سلول‌های اپیدرمی با یکدیگر تفاوت محسوسی نشان دادند، به نحوی که این تفاوت‌ها می‌توانند معیار تقریباً مناسبی جهت جداسازی گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید از یکدیگر باشند. نتایج حاصل از فلوسایتومتری نشان داد که با افزایش زمان کلشی‌سین از تعداد گیاهان دیپلوئید کاسته شده و به گیاهان میکسوپلوئید و تتراپلوئید افزوده گشته است. اغلب گیاهان میکسوپلوئید بودند.

منابع

1- Adisorn C. 2004. Lessen operaitingcytogenetic in agriculture. Department of Horticulture, Chaing Mai University, Thailand.

2- Arzani A., and Darvey N.L. 2001. The effect of colchicine on triticale anther-derived plants: Microspore pre-treatment and haploid-plant treatment using a hydroponic recovery system. Euphytica 122: 235-241.

3- Blasco M., Badenes M., and Naval M. 2015. Colchicine-induced polyploidy in loquat (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 120(2): 453-461.

4- Chen L.L. and S.L. Gao. 2007. *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in *Astragalus membranaceus*. Science Horticulture 112: 339-344.

5- Dehghan A. 2009. Evaluation of Tetraploid Induction effects on *Hyoscyamus muticus* L. hairy roots. MSc thesis. Ferdowsi University, Mashad 117 pp. (In Persian)

6- Escandon S., Liliana M., and Alderete C. 2007. *In vitro* polyploidization of *Mecardonia tenella*, a native plant from South America. Scientia Horticulturae 115: 56–61.

7- Farjadi- Shakib M., Mousavi A. and Naderi R. 2012. Optimization of chromosomal preparation and cytological analysis of *in vitro* cultured African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.). Acta Hort 937: 917-922.

8- Farsi M. and Bagheri A.R. 1998. Principal of plant breeding. Mashhad Jahad Daneshgahi publishing. 296 pp. (In Persian)

9- Ghayour Z. 2007. Gerbera tissue culture and evaluation tetraploid plant production by colchicine. MSc Thesis. Ferdowsi University, Mashad, 140 pp.
10- Gu X.F., Yang A.F., Meng H., and Zhang J.R. 2005. *In vitro* induction of tetraploid plants from *Ziziphus jujube* Mill. Cv. Zhanhua. Plant Cell Report 24: 671-676.
11- Hongzhi W., Sixiang Zh., Yueqiu H., Guijun Y., Yufen B., and Youyong Zh. 2007. Diploid female gametes induced by colchicine in Oriental lilies. Scientia Horticulturae 114: 50–53.
12- Hosseini H.R., Chehrazi M., Nabati Ahmadi D., and Mahmoodi Sorestani M. 2014. Effect of Colchicine Treatment on the Autotetraploidy Induction and MorphoPhysiological Traits Alteration in *Catharanthus roseus* cv. alba. Plant Production Technology 13(2): 55-62. (In Persian)
13- Jadrn P., Plavcov O., and Kobza F. 2010. Morphological changes in colchicine-treated *Pelargonium* × *hortorum* L.H. Bailey greenhouse plants. Horticulture Science 37(1): 27–33.
14- Khan S., Nassb S., and Ali K. 2007. Callus induction, plant regeneration and acclimization of African violet (*Saintpaulia ionantha*) using leaves as explants. Pakistan Journal Botanic 39(4): 1263-1268.
15- Kondorosi E., Roudier F., and Gendrau E. 2000. Plant cell-size: growing by ploidy? Current Opinion in Biotechnology 3: 488-492.
16- Lavania U.C. 2005. Genomic and ploidy manipulation for enhanced production of phyto pharmaceuticals. Plant Genetic Resources 3:170-177.
17- Liu Z., and Gao S. 2007. Micropropagation and Induction of Autotetraploid Plants of *Chrysanthemum cinerariifolium* (Trev.). *In Vitro* Cellular and Developmental Biology: Plant 43(5): 404-408.
18- Malekzadeh S., Ghani A., Habibi M., and Amiri A. 2011. Evaluation ploidy induction by colchicine in *Ocimum basilicum* L. Journal of Horticultural Science 25: 461-469. (In Persian)
19- Masterson J. 1994. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. Science 264: 421-424.
20- Omezzine F., Ladhari A., Nefzi F., Harrath R., Aouni M., and Haouala R. 2012. Induction and flow cytometry identification of mixoploidy through colchicine treatment of *Trigonella foenum-graecum* L. African Journal of Biotechnology 11(98): 16434-16442.
21- Rao S.P., and Suprasanna P. 1996. Methods to double haploid chromosome numbers in *In Vitro* Haploid Production in Higher Plants, S. M. Jain, S. K. Sopory, and R. E. Velleux, Eds. vol. 1, pp. 317–339, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
22- Sajjad Y., Jaskani M.J., Mehmood M., Ahmad I., and Abbas H. 2013. Effect of colchicine on *in vitro* polyploidy induction in African marigold (*Tagetes erecta*). Pakistan Journal Botanic 45(3): 1255-1258.
23- Senvirtne K.S.C.N., Krishnarajah S.A., Wijesundara D.S.A., and Palipane P.W.U.B. 2002. Colchicine induced floral variations African violet (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl.). Annals of the Serilanka Departmant of Agriculture 4: 227-232.
24- Sharma A.K., and Sharma A. 1980. Chromosome techniques theory and practice. Archan. 3th edn. Kailsh Baloni. India pp.312.
25- Swanson C.P. 1957. Cytology and cytogenetics. Prentice Hall, Englewood, cliffs, New Jersey.
26- Takamura T., Lim K.B., and Van J.M. 2002. Effect of a new compound on the mitotic polyploidization of *Lilium longiflorum* and oriental hybrid Lilies. ISHS Acta Horticulturae 572: 37-42.
27- Tambong J.T., Sapra V.T., and Garton S. 1998. *In vitro* induction of tetraploids in colchicine-treated cocoyam plants. Euphytica 104: 191–197.
28- Tatsuzawa F., and Hosokawa M. 2016. Flower colors and their anthocyanins in Saintpaulia cultivars (Gesneriaceae). Hortic. J. 85: 63–69.
29- Teixeira da Silva J.A., Dewir Y.H., Wicaksono A., Kher, M.M., Kim H.-H., Hosokawa M.,Zeng S.-J. 2016. Morphogenesis and developmental biology of African violet (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl.). J. Plant Dev. 23: 15–25.
30- Thao N.T.P., Ureshino K., Miyajima L., Ozaki Y., and Okubo H. 2003. Induction of tetraploids in ornamental Alocasia through colchicine and oryzalin treatments. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 72: 19-25.
31- The Plant List, 2017. *Saintpaulia*. http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q= *Saintpaulia* (last accessed: 30 March, 2017).
32- Van Tuyl M., and Lim K. 2003. Interspecific Hybridization and Polyploidization as Tools in Ornamental. Acta Hort 612, ISHS.
33- Wongprichachan P., Huang K., Hsu Sh., Chou Y., Liu T., and Okubo H. 2013. Induction of Polyploid *Phalaenopsis amabilis* by N2O Treatment .J. Fac. Agr., Kyushu Univ. 58(1): 33–36.

Journal of Horticultural Science
Vol. 35, No.2, Summer 2021, P. 183-194
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد 35، شماره 2، تابستان 1400، ص. 194-183
شاپا: 4730 - 2008

Effects of *In vitro* Ployploidy Induction on Morphological and Cytological Traits Variation in *Saintpaulia ionantha* Wendl.

A. Amiri[5]- M. Shoor[2*]- M. Taghizade[3]- H- Nemati[4]- A. Tehranifar[5]
Received: 28-07-2018
Accepted: 22-07-2020

Introduction: The genus of African violet is the most common genus known among the plants of Gesneriaceae family. This genus has beautiful leaves and flowers that are zygomorph. African violet (*Saintpaulia ionantha*) is a famous ornamental plant due to its various colors and shapes that an excellent model system for *in vitro* regeneration studies because of its tissue culture amenability. Besides the importance of this plant in plant production industry and increasing need for new plant varieties with desired traits, more studies for creating African violet with new features by increasing the ploidy level under the in vitro conditions were not done until now. Polyploidy is a widespread phenomenon in the evolution of flowering plant and a key in plant speciation and diversification. Polyploid plants have been used in plant breeding programs for developing superior varieties and restoring the fertility of interspecific or intergeneric hybrids. Polyploidy in ornamental crops were successfully obtained under in vitro conditions. The chemical colchicine can be used as the most effective substance to obtain polyploid plants. In vitro polyploidization has number of advantages such as treatment of more plants with less material, control of test conditions, lower toxicity of chemicals and high success rate. This study with the aim of polyploid induction was carried out by different concentrations of colchicine at various periods under *in vitro* conditions.

Materials and Methods: The best treatment for the shoot regeneration and proliferation was MS medium with 2 mg/l BA after optimizing the tissue culture process. The study performed as follows: plantlets grown under in vitro in proliferation stage were treated with colchicine. The experiment was carried out in a 2-factorial manner based on a completely randomized design and factors were colchicine concentration at 0.02, 0.05, 0.1% and treatment duration for 18, 24, 48 hours. Evaluated characters of regenerated plants were as follows: plantlets survival percentage (the first month, the second month and the third month), morphological traits (include leaf number, petiole length, leaf length, leaf width, petiole diameter, leaf thickness and variation in form, vein, tip and margins leaf), reproductive traits (flower diameter (mm), number of petal, number of flower in inflorescence, height of inflorescence (mm)), microscopic epidermal cells in samples of diploid and tetraploid and ploidy levels. Assessment of flow cytometery was also used for all of the treated plants with colchicine and some diploid control plants and were expressed in the form of the percentage of diploid, mixoploid and tetraploid plants of African violet.

Results and Discussion: Results indicated that tetraploidy induction successfully was changed different morphological and cytological characteristics. Plantlets of treated with 0.02% colchicine in all three times only survived after three months, and with increasing treatment time, plantlets survival percentage was reduced. Thus 0.02% colchicine treatment for 24 hour found effective in inducing *in vitro* culture polyploidy of African violet. Comparison of the leaves of tetraploid with diploid plants indicated that the leaves of tetraploid plants in length and width were bigger than the diploid ones. The selected tetraploid plants showed a more compact shape than the control plants. Other results revealed that the treated plants with colchicine showed delayed growth. The assessment of microscopic indicated that the epidermal cells of tetraploid were larger than diploid. The results of flow cytometery evaluation showed that with increasing duration of colchicine, the number of diploid plants reduced and were added to mixoploid and tetraploid plants. Most plants were mixoploid.

Conclusion: The results of this study showed that the diploid and tetraploid plants indicated significant differences in term of morphological traits like leaf number, petiole length, leaf length, leaf width, petiole

---

1- Graduated Ph.D, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2, 4 and 5- Associate Professor, Assistant Professor and Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, respectively.
(*- Corresponding Author Email: Shoor@um.ac.ir)
3- Associate Professor, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran
DOI: 10.22067/jhs.2021.58723.0

diameter, leaf thickness and variation in form, vein, tip and margins leaf, reproductive traits like flower diameter, number of petal, number of flower in inflorescence and also size of epidermal cells and flow cytometery evaluation. These differences can be suitable criterion for separating diploid and polyploid plants from each other. Generally, the combination of tissue culture methods and tetraploidy induction can be used as a rapid strategy for achieving new forms and properties of regenerates *in vitro* on African violet.

Keywords: Colchicine, Flow cytometry, Mixoploidy, Regeneration